การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและกลุ่มสารระเหย จากไวน์ลูกไหน (*Prunus domestica* L.)

The Study on Antioxidant Activities and Volatile Compounds from Plum (*Prunus domestica* L.) Fruit Wine

นิพนธ์ สนหอม[1] กิตติยา โชว์พานิช[1] เอื้องพร สมศรี[1] กัณฐวุฒิ บุญมี[1] จิรายุ มีสุข[1]
คมแข พิลาสมบัติ[2] วีระพงษ์ วรประโยชน์[3] วรรณพ วิเศษสงวน[3] และ กฤตพร รำจวนเกียรติ[1*]

Nipon Sonhom[1] Kittiya Showpanish[1] Aueangporn Somsri[1] Kanthawut Boonmee[1] Jirayu Meesuk[1]
Komkhae Pilasombut[2] Weerapong Woraprayote[3] Wonnop Visessanguan[3] and Kittaporn Rumjuankiat[1*]

[1]คณะเทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาลัยนวัตกรรมเกษตรเทคโนโลยีชีวภาพ และอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี ประเทศไทย
[2]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
[3]ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี
[1]Faculty of Biotechnology, College of College of Agriculture Innovation Biotechnology and Food, Rangsit University, Pathum Thani, Thailand
[2]Department of Animal Production Technology and Fisheries, Faculty of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand
[3]Food Biotechnology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
Thailand Science Park, Pathum Thani, Thailand
**Corresponding author, E-mail:Kittaporn.r@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ชนิดของกลุ่มสารระเหย ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณโลหะหนักในไวน์ลูกไหนที่หมักโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5918 หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักเป็นเวลา 16 วัน พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ลดลงจาก 23.00 ± 0.00 ^{o}Brix เหลือเพียง 8.67 ± 0.89 ^{o}Brix และมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 13.43±0.12% การวิเคราะห์สารระเหยในไวน์ลูกไหนโดยใช้เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่ามีกลุ่มของสารระเหยจำนวน 7 กลุ่ม ได้แก่ 3-methyl-1-butanol, Butyrolactone, Phenylethyl alcohol, Octanoic acid, 2-phenylethyl ester, Decanoic acid และ Benzene ethanol การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ไวน์ลูกไหนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.65±0.04% และ 2.28±0.15% เมื่อทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) และ 2,2'-azino-bis[3-

ethylbenzthiazoline6-sulfonic acid] ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Reducing power พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.84±0.04% สารประกอบฟีนอลิกในไวน์ลูกไหนมีปริมาณ 1004.70±3.42 mgGAE/100 ml การวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography equipped with a flame ionization detector (GC-FID) พบว่ามีปริมาณเมทานอลในไวน์ลูกไหนเท่ากับ 0.007±0.00017% (v/v) การวิเคราะห์โลหะหนักในผลิตภัณฑ์ไวน์ลูกไหนด้วยเครื่อง Atomic absorption spectroscopy (AAS) พบทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม และสารหนู ในปริมาณ <1.0 x 10^{-3}, 7.9 x 10^{-6}, <1.0 x 10^{-5} และ 5.3 x 10^{-7} mg/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.)

คำสำคัญ: *ไวน์ลูกไหน, สารต้านอนุมูลอิสระ, กลุ่มสารระเหย*

Abstract

The purpose of this research was to study the physical properties, volatile compounds, antioxidant activity, and metal concentrations of plum (*Prunus domestica* L.) fruit wine using *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5918 in fermentation process. After sixteen days of fermentation, the total soluble solid (TSS) gradually dropped from 23.00 ± 0.00°Brix to 9.17 ± 0.58°Brix and the alcohol concentration was approximately 13.43±0.12% w/v. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis detected seven volatile compounds including 3-methyl-1-butanol, butyrolactone, phenylethyl alcohol, octanoic acid, 2-phenylethyl ester, decanoic acid and benzene ethanol in the product. According to the determination of antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) assay and 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline6-sulfonic acid] ($ABTS^{+}$), the IC_{50} values were 0.65 ± 0.04% and 2.28 ± 0.15%, respectively. The antioxidant activity assay by reducing power method showed that the EC_{50} was 2.84 ± 0.04%. Additionally, the total phenolic content was determined as 746.64±3.10 mgGAE/100 ml sample. The methanol content was detected at only 0.007% (v/v) in plum wine using gas chromatography equipped with a flame ionization detector (GC-FID). The atomic absorption spectroscopy (AAS) analysis showed that heavy metals consisting of Pb, As, Cu and Cd were detected at <1.0 x 10^{-3}, 7.9 x 10^{-6}, <1.0 x 10^{-5} and 5.3 x 10^{-7} mg/ml, respectively, which were in compliance with Thai Industrial Standards Institute (TISI) limits.

Keywords: *plum wine, antioxidant, volatile compounds*

1. บทนำ

ลูกไหน จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลางอยู่ในสกุล *Prunus* ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Prunus domestica* L. (Mehta, Sanchi *et al.*, 2014) ผลแก่มีลักษณะนวลสีขาว เมื่อสุกเปลือกจะมีสีม่วงอมดำ เนื้อสีเหลือง มีรสชาติหวานหรือหวานอมเปรี้ยว ลูกไหนเป็นแหล่งของสารประกอบสำคัญหลายชนิด เช่น ไฟเบอร์ เอนไซม์ แร่ธาตุ วิตามิน โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม (Ertekin et al., 2006) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Kristl et al., 2011)

ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยป้องกันการเกิดโรคหลายชนิด (Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2001) อาทิ ช่วยในเรื่องการไหลเวียนโลหิต โรคหัด โรคทางเดินอาหาร (Li, 2008) ป้องกันโรคมะเร็ง เบาหวาน และความอ้วน เป็นต้น (Kristl *et al*., 2011)

ไวน์ เป็นเครื่องดื่มที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายหากดื่มในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นให้เจริญอาหารทำให้สามารถบริโภคอาหารได้ดีขึ้น ช่วยเสริมกลิ่นรสของอาหาร อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และช่วยทำให้หลอดเลือดหัวใจไม่ตีบตัน (Kristl *et al*., 2011) และไวน์ยังเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ทั่วโลกนิยมบริโภค ทำให้ไวน์เป็นอีกหนึ่งธุรกิจที่มีอัตราการเติบโตสูงขึ้นทุกปี ซึ่งนอกจากไวน์ที่ผลิตจากองุ่นแล้วไวน์ที่ผลิตจากผลไม้ชนิดอื่นก็ได้รับความนิยมเช่นกัน ในประเทศไทยมีการหมักไวน์โดยใช้ผลไม้ในท้องถิ่นชนิดต่าง ๆ อาทิ มะเกี๋ยง (Chomsri *et al*., 2012) หมากเม่า (Nuengchamnong and Ingkaninan, 2010) ลูกหม่อน (Butkhup *et al*., 2011) และมะม่วงหาวมะนาวโห่ (Rumjuankiat *et al*., 2018) เป็นต้น โดยกระบวนการหมักมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือใช้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ และลักษณะสำคัญของไวน์ที่ทำให้ได้รับความนิยมทั่วโลก คือ การที่ไวน์มีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์โดยมีกลุ่มสารระเหยที่ให้กลิ่นแตกต่างกันออกไป เช่น Ethyl acetate, Acetaldehyde และ Isobutanol (Parish and Carroll 1987) นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระในไวน์ยังเป็นอีกจุดเด่นหนึ่งที่ทำให้ไวน์ได้รับความนิยม (Kristl *et al*., 2011) ปัจจุบันลูกไหนเข้าสู่ตลาดเป็นจำนวนมากจนล้นตลาด ขายได้ราคาต่ำและไม่มีตลาดหรือโรงงานรองรับ ดังนั้นการนำลูกไหนมาแปรรูปเป็นไวน์อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สร้างมูลค่าเพิ่มหรือสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร โดยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้ลูกไหนเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการหมักไวน์ พบว่าสามารถหมักไวน์ได้ภายในเวลา 16 วัน โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5918 การทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาคุณสมบัติของไวน์ลูกไหนที่หมักได้ สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบ รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำผลิตภัณฑ์ไวน์ออกสู่ตลาด ทางคณะผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์การปนเปื้อนเมทานอลและโลหะหนักในผลิตภัณฑ์เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.)

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและกลุ่มสารระเหยชนิดต่าง ๆ ในไวน์ลูกไหน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์ลูกไหน
3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลและโลหะหนักในไวน์ลูกไหน
4. เพื่อยกระดับมูลค่าของลูกไหนให้สูงขึ้น

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับหมักไวน์

เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5918 ในอาหาร YMB (Himedia, India)ปริมาตร 100 ml หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ให้ได้จำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^8 CFU/ml จึงถ่าย

เชื้อลงในขวดแก้วซึ่งบรรจุน้ำลูกไหนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 L หลังจากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2. การผลิตไวน์ลูกไหน

คัดเลือกผลลูกไหนที่ซื้อมาจากตลาดสี่มุมเมือง จ.ปทุมธานี โดยเลือกลูกที่มีลักษณะดี ไม่มีรอยเน่า แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดโดยเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (w/v) วัดค่าความหวานเริ่มต้น (ºBrix) โดยใช้ Hand-held digital refractometer; (ATAGO, Japan) แล้วทำการปรับค่าความหวานด้วยน้ำตาลทรายให้ได้เท่ากับ 24ºBrix ต้มที่อุณหภูมิ 70ºC เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5918 ปริมาตร 10% (v/v) หมักที่อุณหภูมิห้องจนกว่าปริมาณแอลกอฮอล์จะคงที่

3.3. การวิเคราะห์ทางกายภาพ

เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid หรือ TSS; ºBrix) โดยการใช้เครื่อง Hand refractometer วัดค่า pH ด้วย pH meter (Suntex, Taiwan) และวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer (Laboratoires Dujardin-Salleron, France) ซึ่งดัดแปลงวิธีมาจาก Sevda and Lambert, (2011) ทำการวัดค่า 3 ซ้ำ แล้วนำมาเฉลี่ยบันทึกผลการทดลอง

3.4. การวิเคราะห์กลุ่มของสารระเหย

การวิเคราะห์หากลุ่มของสารระเหยด้วย Gas chromatography-mass spectrometry หรือ GC-MS (Agilent Technologies, USA) ควบคู่กับ Mass selective detector inert XL high performance turbo pump (Agilent Technologies model 7890A) โดยใช้คอลัมน์ Mega-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 µm film thickness) แล้วตรวจด้วยเครื่องตรวจวัดมวล (กระแสไฟ 70 eV) อุณหภูมิ 40ºC นาน 2 นาที ฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 µl วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต ประเทศไทย

3.5. การวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลและโลหะหนัก

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของเมทานอลโดยใช้ Gas chromatograph equipped with a flame ionization detector หรือ GC-FID (Agilent Technologies, USA) เครื่องตรวจวัดและอุณหภูมิหัวฉีดเท่ากับ 250 และ 150ºC ตามลำดับ ทำการฉีดตัวอย่างปริมาตร 500 µl ส่วนการวิเคราะห์หาค่าโลหะหนักได้แก่ ตะกั่ว สารหนู ทองแดง และแคดเมียม โดยใช้เครื่องมือ Atomic absorption spectroscopy หรือ AAS (Thermo Scientific™ iCE™ 3500, USA)

วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต ประเทศไทย

3.6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

วิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu (VER, France) ของ Siddiqui *et al.* (2017) โดยใช้ตัวอย่างไวน์ลูกไหน ปริมาตร 1 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 ml เติมสารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Sodium carbonate (Sigma-Aldrich, Germany) ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 ml ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 60 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Beckman Coulter Model Avanti JE, USA) ที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm อุณหภูมิ 25ºC นาน 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu model UV-1601, Japan) ที่ความยาวคลื่น 734 nm. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงเป็น Gallic acid equivalent per 100 ml of sample (mgGAE/100 ml)

3.7. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.7.1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH Radical- scavenging activity)

ดัดแปลงวิธีจาก Marković *et al.* (2015) โดยนำตัวอย่างไวน์ลูกไหนปริมาตร 2 ml เติมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Germany) ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 2 ml ในขณะที่กลุ่มควบคุมนั้นใช้เอทานอลปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm. โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (Sigma-Aldrich, Germany) เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตร % Inhibition of DPPH = $[1-(A_s - A_b) / A_c] \times 100$ เมื่อกำหนดให้ A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH; A_B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และ A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

3.7.2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS Radical-scavenging)

ดัดแปลงจากวิธีของ Hosu *et al.*, (2011) โดยการเตรียมสารละลาย (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich, Germany) ที่มีการผสมสารละลาย $ABTS^+$ ความเข้มข้น 7 mM กับสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM (Unilab, New Zealand) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วเจือจางกับเอทานอล 95% ที่อัตราส่วน 1:80 จากนั้นจึงเจือจางกับตัวอย่างไวน์ลูกไหนในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้ปริมาตร 0.3 ml ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย $ABTS^+$ ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm. นำค่าที่ได้คำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ตามสูตรการทดสอบ DPPH ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

3.7.3. การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์สาร (Reducing power)

ดัดแปลงวิธีจาก Ganesan *et al.* (2008) นำตัวอย่างไวน์ลูกไหนเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ดูดมาปริมาตร 1 ml เติมสารละลาย Phosphate buffer ที่ pH 6.6 ความเข้มข้น 200 mM ปริมาตร 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน เติม Potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich, Germany) ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 2.5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC นาน 20 นาที แล้วเติม Trichloroacetic acid (Merck, Germany) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 2.5 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 ml แล้วเติม Ferric chloride ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm. คำนวณหาค่า EC_{50} โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

3.8. การวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (CRD) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One-way ANOVA และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.0 (SPSS lnc., Chicago, lll, USA)

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ทางกายภาพของไวน์ลูกไหน

หลังจากหมักลูกไหนด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5918 เป็นเวลา 16 วัน พบปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 13.43±0.12% ปริมาณ TSS 8.67±0.89 ^{o}Brix ค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 2.70-2.93 จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณ TSS และค่า pH ของวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการหมักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับของวันที่ 0 (ตารางที่ 1)

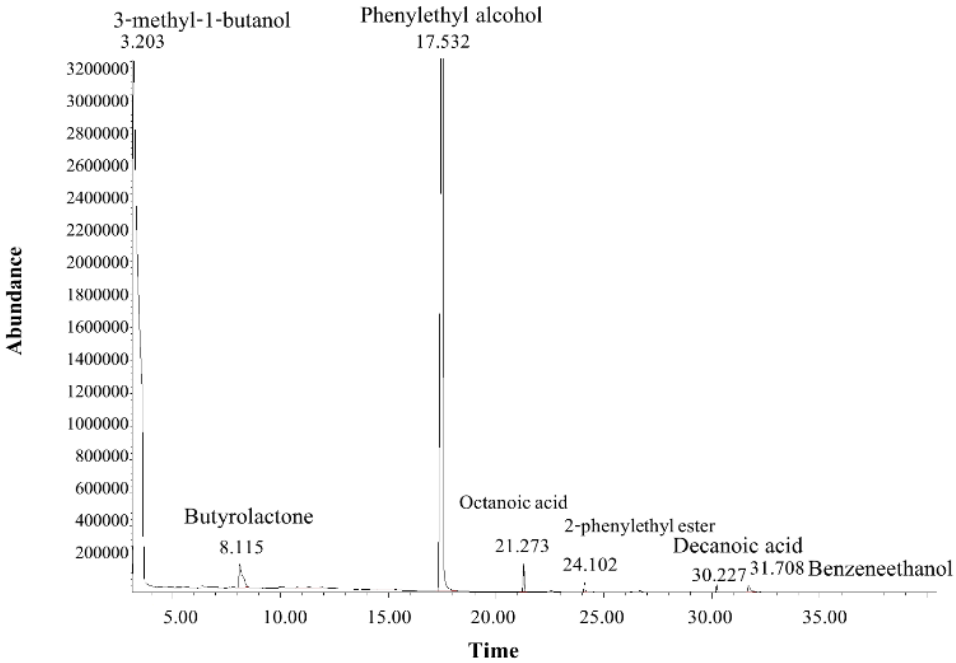
ตารางที่ 1 ผลของการหมักแอลกอฮอล์ในการผลิตไวน์ลูกไหน

ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (^{o}Brix)	ค่า pH
0	0.00±0.00^{a}	23.00±0.00^{a}	2.88±0.01^{a}
2	4.47±0.15^{b}	18.00±0.00^{b}	2.78±0.16^{b}
4	7.43±0.06^{c}	15.00±0.00^{c}	2.70±0.00^{b}
6	9.40±0.17^{d}	13.27±0.23^{d}	2.80±0.01^{c}
8	11.63±0.12^{e}	11.00±0.00^{e}	2.85±0.02^{d}
10	12.43±0.12^{f}	9.90±0.00^{f}	2.81±0.01^{e}
12	13.03±0.23^{g}	9.00±0.00^{g}	2.81±0.01^{ce}
14	13.43±0.12^{h}	8.50±0.50^{h}	2.92±0.01^{f}
16	13.43±0.12^{h}	8.67±0.29^{gh}	2.93±0.01^{f}

$^{a-i}$ คือ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

± คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ การทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณเมทานอลมีค่าเท่ากับ 0.007±0.00017% (v/v) และเมื่อวิเคราะห์กลุ่มสารระเหยจากไวน์ลูกไหน พบว่ามีกลุ่มสารระเหยจากไวน์ลูกไหนจำนวน 7 กลุ่ม คือ 3-methyl-1-butanol, butyrolactone, phenylethyl alcohol, octanoic acid, 2-phenylethyl ester, decanoic acid และ benzeneethanol แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์กลุ่มของสารระเหยด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนัก ทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม และสารหนู พบว่าโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณ $<1.0 \times 10^{-3}$, 7.9×10^{-6}, $<1.0 \times 10^{-5}$ และ 5.3×10^{-7} mg/ml ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่าไวน์ลูกไหนมีปริมาณโลหะหนักไม่เกินมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) ที่ระบุว่าต้องมีปริมาณทองแดงน้อยกว่า $< 5x10^{3}$ ตะกั่ว $< 2x10^{2}$ และสารหนู $< 1x10^{2}$ mg/ml อย่างไรก็ตามสำหรับสารแคดเมียมมิได้มีการระบุปริมาณไว้ใน สมอ.

4.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์ลูกไหน พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมเท่ากับ 1004.70 ± 3.42 mgGAE/100 ml การวิเคราะห์หาปริมาณการต้านอนุมูลอิสระของไวน์ลูกไหน ด้วยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH การฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ และการรีดิวซ์สาร (Reducing power) พบว่าในไวน์ลูกไหนมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.65 ± 0.04%, 2.28 ± 0.15% และ 2.84 ± 0.04% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์ลูกไหนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิก พบว่าไวน์ลูกไหนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า

ตารางที่ 2 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระของไวน์ลูกไหน

ตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์		
	DPPH IC_{50} (%)	$ABTS^+$ IC_{50} (%)	Reducing power EC_{50} (%)
ไวน์ลูกไหน	0.65 ± 0.04	2.28 ± 0.15	2.84 ± 0.04
สารมาตรฐาน			
L-ascorbic acid	0.0032 ± 0.03	0.002 ± 0.11	0.005 ± 0.05

IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50%

EC_{50} คือ ความเข้มข้นที่มีความสามารถในการลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50%

± คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่าง 3 ซ้ำ การทดลอง

5. การอภิปรายผล

โดยทั่วไปกระบวนการผลิตไวน์จากผลไม้จะมีลักษณะคล้ายกับการผลิตไวน์จากองุ่น (Kosseva *et al.*, 2017) โดยปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักไวน์ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล อุณหภูมิ และค่า pH ของน้ำผลไม้ (Dias *et al.*, 2007) ดังนั้นค่า TSS จึงมีผลโดยตรงต่อปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของแอลกอฮอล์หลังกระบวนการหมัก (Conde *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามหากมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไป อาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ได้ (Medina *et al.*, 2012) หรือหากในกระบวนการหมักมีแอลกอฮอล์เพิ่มมากขึ้น แอลกอฮอล์ก็จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้เช่นกัน (Stanley *et al.*, 2010)

กลุ่มของสารระเหยที่วิเคราะห์ได้จากไวน์ลูกไหนจำนวน 7 กลุ่ม ได้แก่ 3-methyl-1-butanol, Butyrolactone, Phenylethyl alcohol, Octanoic acid, 2-phenylethyl ester, Decanoic acid และ Benzeneethanol สามารถพบได้ทั่วไปในไวน์ผลไม้ (Oliveira *et al.*, 2011; Panteli*ć* *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017; Wondra and Berovic, 2001) จากการทดลองพบว่า Phenylethyl alcohol เป็นสารประกอบของแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์ลูกไหนซึ่งให้กลิ่นคล้ายกับดอกกุหลาบ (Wondra and Berovic, 2001) การวิเคราะห์หาค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ $ABTS^+$ จะแสดงผลเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% หากค่าที่ได้ต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธี Reducing power จะแสดงผลเป็นค่า EC_{50} โดยหมายถึง ความเข้มข้นที่มีความสามารถในการลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50% หากค่าที่ได้ต่ำต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี เช่นเดียวกับวิธี DPPH และ $ABTS^+$ (Govindan and Muthukrishnan, 2013) ส่วนโพลีฟีนอลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ สามารถถูกสกัดออกมาด้วยแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตไวน์ (Jagtap and Bapat, 2015) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นและองค์ประกอบต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งของผลไม้และวิธีการผลิตไวน์ด้วย (Pinto *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตาม ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อาจสามารถพบโลหะหนักได้ เนื่องจากการตกค้างของผลิตภัณฑ์เคมีทางการเกษตรรวมถึงยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการเพาะปลูกพืช หรืออาจปนเปื้อนได้จากภาชนะที่ใช้ในกระบวนการหมัก และการบรรจุ (Klari*ć* *et al.*, 2011) ในไวน์ลูกไหนที่หมักได้ตามการทดลองนี้ พบว่ามีปริมาณโลหะหนักต่ำกว่าที่กฎหมายกำหนด นอกจากนี้ปริมาณเมทานอลที่วิเคราะห์พบในไวน์ลูกไหนจัดว่าไม่ เป็นอันตรายต่อ

มนุษย์ ตามที่ Reddy *et al.* (2008) ได้รายงานไว้ว่า ปริมาณเมทานอลที่ไม่มีผลอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ควรมีปริมาณไม่เกิน 100 mg/L

6. บทสรุป

จากการทดลองหมักแอลกอฮอล์จากลูกไหนด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S.cerevisiae* TISTR 5918 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าในไวน์ลูกไหนมีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 13.4% และสารระเหย 7 กลุ่มซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ไวน์ และเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จะเห็นได้ว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ต้องการประโยชน์จากการดื่มไวน์ และเป็นการช่วยยกระดับราคาของลูกไหนให้สูงขึ้นเพื่อให้เกษตรกรมีรายได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีปริมาณโลหะหนักที่น้อยมาก ซึ่งผ่านเกณฑ์การทดสอบปริมาณโลหะหนักตรงตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) ที่ระบุไว้

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยคณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและการให้คำปรึกษาในการทดลองครั้งนี้

8. เอกสารอ้างอิง

Butkhup, L., Jeenphakdee, M., Jorjong, S., Samappito, S., Samappito, W. and Chowtivannakul, S. (2011). HS-SPME-GC-MS analysis of volatile aromatic compounds in alcohol related beverages made with mulberry fruits. Food Science and Biotechnology. 20(4): 1021-1032.

Chomsri, N., Grossmann, M., Commins, T. and Srisamatthakarn, P. (2012). Research and development plan for fruit wine production in Thailand using *Makiang* as a case study. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 5(01):39-44.

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A., Tavares, M. R., Sousa, M., Agasse, A., Delrot, S. and Gerós, H. (2006). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. Global Science Books:Food. 1(1):1-22

Dias, D. R., Schwan, R. F., Freire, E. S. and Serôdio, R. d. S. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. International Journal of Food Science & Technology. 42:319-329.

Ertekin C, Gozlekci S, Kabas O, Sonmez S, Akinci I (2006). Some physical, pomological and nutritional properties of two plum cultivars. Journal of Food Engineering. 75(4): 508-514.

Ganesan, P., Chandini, S.K., and Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its fractions obtained from selected Indian red seaweeds. Bioresource Technology. 99:2717–2723.

Govindan, P. and Muthukrishnan, S. (2013). Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. Journal of Acute Medicine. 3(3):103-109.

Hosu, A., Cimpoiu, C., Miclaus, V., Danciu, V., and Inceu, M. (2011). Antioxidant activity and total phenolic content of some Romanian red wines. Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia. 1:55-62.

Jagtap, U. B. and Bapat, V. A. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of wine prepared from custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits. Journal of Food Processing and Preservation. 39(2015):175-182.

Klari**Ć**, D. A., Klari**Ć**, I., Veli**Ć**, D., and Dragojevi**Ć**, I. V. (2011). Evaluation of mineral and heavy metal contents in croatian blackberry wines. Czech Journal of Food Sciences. 29:260–267.

Kosseva, M., Joshi, V. K. and Panesar, P. S. (2017). Specific features of table wine production technology. In: Panesar, PS, Kosseva, M, and Joshi, VK ed. Science and technology of fruit wine production. Elsevier Science Publishing Co Inc, Academic Press, pp.295-461.

Kristl, J., Slekovec, M., Tojnko, S. and Unuk, T. (2011). Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L.): Evolution during on-tree ripening. Food Chem., 125: 29-34

Li TSC (2008). Vegetables and fruits: nutritional and therapeutic values. Taylor and Francis Group, USA, 202-203.

Markovi**Ć**, M., Martinovi**Ć** Bevanda, A. and Tali**Ć**, S. (2015). Antioxidant activity and total phenol content of white wine Žilavka. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina. pp. 1-4

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E. and Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Journal of Food Microbiology. 157: 245-250.

Mehta, S., Soni, N., Satpathy, G., & Gupta, R. (2014). Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant andantibacterial activity of dried plum (*Prunus domestica*). Journal of Pharmacognosy andPhytochemistry. 3(2): 166-171.

Nuengchamnong, N. and Ingkaninan, K. (2010). On-line HPLC–MS–DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. Food Chemistry. 118(1):147-152.

Oliveira, M. E. S., Pantoja, L., Duarte, W. F., Collela, C. F., Valarelli, L. T., Schwan, R. F. and Dias, D. R. (2011). Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. Food Research International. 44(7):2391-2400.

Panteli**Ć**, M., Dabi**Ć**, D., Matijaševi**Ć**, S., Davidovi**Ć**, S., Doj**Č**inovi**Ć**, B., Milojkovi**Ć**-Opsenica, D., Teši**Ć**, Ž. And Nati**Ć**, M. (2014). Chemical characterization of fruit wine made from obla**Č**inska; inska sour cherry. The Scientific World Journal. 1-9.

Parish, M. E. and Carroll, D. E. (1987) Fermentation Characteristics of Saccharomyces cerevisiae Isolates from Vitis rotundifolia Grapes and Musts. American Journal for Enology and Viticulture. 38: 45-48.

Pinto, P. C. A. G., Saraiva, M. L. M. F. S., Reis, S. and Lima, J. L. F. C. (2005). Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. Analytica Chimica Acta. 531:25-32.

Reddy, L. V., Reddy, Y. H. K., Reddy, L. P. A. and Reddy, O. V. S. (2008). Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. Process Biochemistry. 43(7):748-752.

Rumjuankiat, K., Sonhom, N., Showpanish, K., Somsri, A., and Pilasombut, K. (2018). *In vitro* antioxidant activities and volatile compounds from karanda (*Carissa carandas* L.) fruit wine. Journal of Agricultural Technology. 14(7): 1843-1860.

Sevda, S. and Lambert, R. (2011). Fermentative behavior of Saccharomyces strains during guava (*Psidium Guajava* L.) must fermentation and optimization of guava wine production. Journal of Food Processing and Technology. 2:118.

Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A. and Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). Journal of Taibah University Medical Sciences. 12(4):360-363.

Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P.E., Hussain, E.A., Damayanti-Wood, B.I. and Farnsworth, N.R. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 41(4): 251-286.

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. and Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology. 109(1):13-24.

Wondra, M. and Berovic, M. (2001). Analyses of aroma components of chardonnay wine fermented by different yeast strains. Food Technology and Biotechnology. 39(2):141-148.

Xu, S., Jiangyu, Z., Zhao, Q., Hardie, J. and Hu, B. (2017). Changes in the profile of aroma compounds in vitis vinifera l. c v merlot from grapes to wine. Bangladesh Journal of Botany. 46:1089-1098.